

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Untersuchungen zum Alkali-
Jonentransport bei E. coli B 163 und
seiner K - Mangelmutante E. coli B 525

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Friedbert Dorn
aus Singen

1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Untersuchungen zum Alkali-
Jonentransport bei E.coli B163 und
seiner K - Mangelmutter E.coli B525

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Friedbert Dorn
aus Singen

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Priv.Doiz.Dr.med. Theodor G ü n t h e r

Korreferent: Professor Dr. med. Dr. rer nat.
Heinz T i e d e m a n n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 27.8.1968

Inhaltsverzeichnis

Einführung	S. 1
Ergebnisse	
I. ATPase von E. coli B 163 und E. coli B 525	S. 5
II. Aufnahme und Abgabe von K^+ und Na^+ bei E. coli B 163 und der K-Mangelmutante E. coli B 525	S. 18
Diskussion	S. 38
Material und Methoden	S. 43
Zusammenfassung	S. 50
Literatur	S. 51

Untersuchungen zum Alkali-Jonentransport bei E. coli
B 163 und seiner K-Mangelmutante E. coli B 525

In der Regel findet sich im Zellinnern eine höhere K-Konzentration und eine niedrigere Na-Konzentration als extrazellulär (s. Tab. 1). Für diese unterschiedliche Ionenverteilung wird ein in der Zellmembran lokalisierter, stoffwechselabhängiger, energieverbrauchender Transportprozeß verantwortlich gemacht, dessen Mechanismus noch nicht bekannt ist (1).

Zellart	K _{IZF}	Na _{IZF}	Literatur
Erythrozyten (Mensch)	130	16,8	(2) (3)
Erythrozyten (Hund)	8,2	113	(4) (5)
Erythrozyten (Katze)	5,9	104	(6)
Erythrozyten (Schaf)			
Typ I HK	121	36	(7)
Typ II LK	17,3	139	(7)
Leber (Ratte)	179	5,4	(8)
Muskel (Ratte)	153	18,6	(8)
Ascites-Tumor-Zelle	134	50	(9)
E. coli	211	50	(10)

alle Angaben in mMol/l

Eine Ausnahme von dieser normalen Elektrolytverteilung bilden die Erythrozyten von Hund und Katze. Bei ihnen besteht zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Flüssigkeit kein Na- oder K-Konzentrationsgradient.

Schaferythrozyten verhalten sich ähnlich. Etwa 10 % der untersuchten Tiere hatten Erythrozyten mit einem hohen K-Gehalt von 90 mMol/l, während die intrazelluläre K-Konzentration bei den Erythrozyten der anderen Tiere nur 10-30 mMol/l betrug (7). Für die Eigenschaft, Erythrozyten mit niederem intrazellulärem K-Gehalt zu bilden, konnte ein dominanter Erbgang nachgewiesen werden (11). Diese Ergebnisse zeigen, daß der Na- und K-Gehalt der Erythrozyten genetisch determiniert ist.

Durch UV-Bestrahlung und Selektion mit Penicillin (14, 15) konnten von Lubin und Kessel (12) sowie Schultz und Solomon (13) aus *E. coli* Mutanten gezüchtet werden, die nur bei hoher extrazellulärer K-Konzentration- $K^+ > 20$ mMol/l-eine für die Proteinsynthese und damit für das Wachstum notwendige intrazelluläre K-Konzentration aufrechterhalten können. Die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der extrazellulären K-Konzentration ist in Abbildung 1 dargestellt. Bei der von Lubin und Kessel gezüchteten Mutante *E. coli* B 525 konnte die Mutation auf dem ringförmigen Bakterienchromosom in der Nähe des Leucin-Markers lokalisiert werden. Die Fähigkeit der Zellen, einen bestimmten K-Konzentrationsgradienten aufrechtzuerhalten, ist also genetisch festgelegt. Jede Mutation beruht auf einer Veränderung der DNS. Dadurch wird an der DNS eine "falsche" m-RNS gebildet. Diese gelangt zu den Ribosomen und veranlaßt dort den Einbau "falscher" Aminosäuren in das entsprechende Enzymprotein. Das neugebildete Enzym ist, falls es überhaupt noch synthetisiert wird, entweder inaktiv oder in seinen enzymatischen Eigenschaften verändert.

Da nach jeder Mutation ein Enzym- bzw. Proteindefekt auftritt, könnte auch für die K-Mangel-Mutante ein Enzymdefekt bestehen. Könnte man bei der Mutante *E. coli* B 525 einen derartigen Defekt nachweisen, so hätte man ein am K-Transport von Bakterien beteiligtes Enzym gefunden.

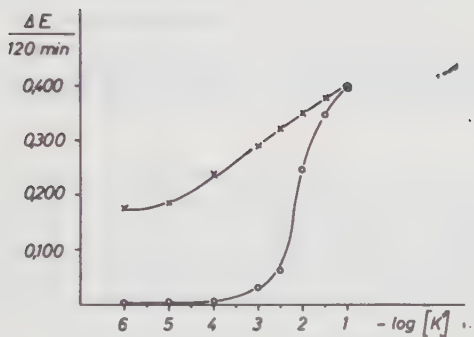


Abb. 1:

Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* B 163 (x) und *E. coli* B 525 (o) in Abhängigkeit von der extrazellulären K-Konzentration.

Die Bakterien wuchsen im Nährmedium (s. Methoden) bei 37° C unter Begasung mit 95 % O₂ - 5 % CO₂. Die Zellkonzentrationen wurden photometrisch bei 405 nm bestimmt.

Als Wachstumsgeschwindigkeit wurde die Extinktionszunahme während der logarithmischen Phase aufgetragen.

(Mittelwerte aus 6 Versuchen)

Mehrere Autoren haben in den letzten Jahren einen Zusammenhang zwischen dem aktiven Na-K-Transport und einer durch Na- und K-aktivierbaren, Mg-abhängigen ATPase in Zellmembranen angenommen (16, 17, 18, 19), denn zwischen beiden Funktionen finden sich bei Erythrozyten folgende Übereinstimmungen (18): Beide benötigen ATP. ITP zeigt keine Wirkung. Beide Systeme brauchen die gleichzeitige Anwesenheit von Na und K. Der Na-K-Transport wie auch die Aktivität der ATPase sind durch Strophanthin hemmbar. Die für die halbmaximale Wirkung von Na, K und Strophanthin benötigten Konzentrationen sind für beide Systeme etwa gleich groß.

Weitere Hinweise für eine Beteiligung der ATPase am aktiven Jonentransport ergeben sich aus den Befunden, wonach die Erythrozyten von Hund und Katze, die Na und K nicht akkumulieren können, auch keine durch Na und K aktivierbare und durch Strophanthin hemmbare ATPase aufweisen (20). Untersuchungen an K-reichen und K-armen Erythrozyten von Schafen zeigten, daß bei den Erythrozyten mit niedriger intrazellulärer K-Konzentration die Aktivität der Na-K-aktivierten ATPase entsprechend herabgesetzt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die ATPase von *E. coli* B 163 und seiner K-Mangelmutante *E. coli* B 525 verglichen. Außerdem sollte an Wildtyp und Mutante der Mechanismus der unterschiedlichen Ionenverteilung zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Flüssigkeit untersucht werden.

Ergebnisse

I. Die ATPase von E. coli B 163 und E. coli B 525

Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Inkubationsdauer, der Substratkonzentration, vom pH, von der Enzymkonzentration und vom pMg

Um optimale Testbedingungen festzulegen, wurden zuerst die enzymatischen Eigenschaften der ATPase-Präparationen untersucht.

Wie Abbildung 2 zeigt, bleibt die Aktivität des Enzyms bis zu einer Inkubationszeit von etwa 30 Min. ziemlich konstant. Bei längerer Inkubation ergab sich eine deutliche Abnahme der Aktivität. Es wurde deshalb für alle Versuche eine Inkubationszeit von 20 Min. gewählt.

Bei einer Substratkonzentration von 5 mMol/l Mg-ATP erreichte die Aktivität der ATPase ein Optimum (Abb. 3).

Abrams et al. (22) fanden dasselbe für die ATPase von *S. faecalis*, ebenso Weibull et al. (25) bei Untersuchungen der ATPase von *Bac. Megaterium*.

Die Coli-ATPase-Präparation zeigte bis zu einem pH von 9,2 kein Optimum (Abb. 4, durchgezogene Linie). Hiermit in Übereinstimmung sind Befunde an *Bac. Megaterium* (25), wonach für die ATPase-Präparation ebenfalls kein pH-Optimum nachgewiesen werden konnte. Dagegen fanden Drapeau und Mcleod (26) für die ATPase gramnegativer Bakterien aus Meerwasser pH-Optima bei 8,8.

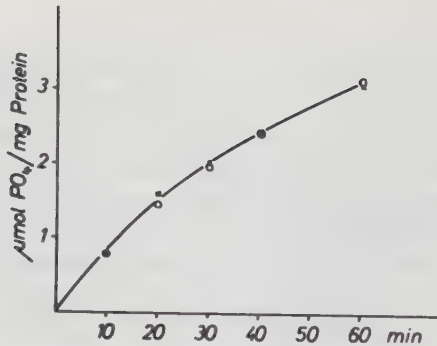


Abb. 2:

Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse von der Zeit.

$[ATP] = 5 \text{ mMol/l}$ $[Mg^{++}] = 5 \text{ mMol/l}$ $[Na^+] = 20 \text{ mMol/l}$ $[K^+] = 100 \text{ mMol/l}$
 Inkubation bei 30°C .

x = E. coli B 163

o = E. coli B 525

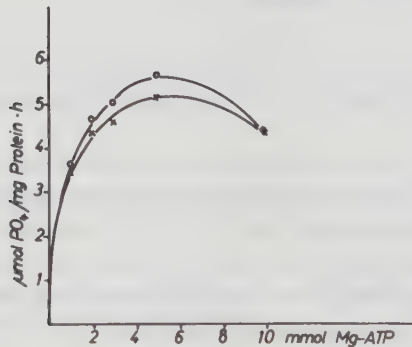


Abb. 3:

Einfluß der Substratkonzentration (Mg-ATP) auf die ATPase-Aktivität.

Endkonzentrationen im Ansatz: $[Na^+] = 20 \text{ mMol/l}$ $[K^+] = 100 \text{ mMol/l}$
 Inkubation 20 Min. bei $T = 30^\circ \text{C}$.

x = E. coli B 163

o = E. coli B 525

Da sich mit zunehmender Proteinmenge im Ansatz eine Abnahme der spezifischen Aktivität der ATPase-Präparation zeigte, wurden für sämtliche Versuche annähernd gleich große Proteinmengen eingesetzt. Dadurch war ein genauer und direkter Vergleich der ATPase-Präparationen von E. coli B 163 und der Mutante E. coli B 525 möglich.

Das pMg-Optimum (Abb. 5, gestrichelte Linie) lag für beide ATPase-Präparationen bei pMg 4.

Wie die bisherigen Ergebnisse zeigen, findet sich kein Unterschied zwischen der ATPase von E. coli B 163 und der K-Mangel-Mutante E. coli B 525 hinsichtlich der enzymatischen Eigenschaften.

Substratspezifität der Coli-ATPase

Um Unterschiede gegenüber anderen ATPasen und Phosphatasen der Bakterienzelle festzustellen, wurde die Substratspezifität der ATPase von E. coli B 163 und E. coli B 525 mit intakten Zellen getestet. Tabelle 2 zeigt, daß die Coli-ATPase ziemlich unspezifisch ist. Alle getesteten Phosphat-ester - ATP, ADP, AMP, Glycerophosphat, Glukose-6-phosphat und para-Nitrophenolphosphat - werden hydrolysiert, wenn auch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Substrat	µMol PO ₄ /mg Protein · h	
	E. coli B 163	E. coli B 525
p-Nitrophenolphosphat	0,02	0,01
Gluc-6-P	0,15	0,12
Glycerophosphat	0,01	0,01
AMP	0,48	0,68
ADP	0,85	1,06
ATP	0,99	1,20

Tabelle 2: Substratspezifität der ATPase

Über Nacht gewachsene Bakterien wurden
120 Min. bei 37° C inkubiert.

Substratkonzentration jeweils 3 mMol/l

$[Mg^{++}]$: 3 mMol/l, $[Na^+]$: 25 mMol/l,
 $[K^+]$: 100 mMol/l, in Tris-Puffer 0,1 M
pH 8,0

Im Gegensatz dazu spaltet die ATPase der Erythrozytenmembran nur ATP (26). Aus Hirn- und Muskelzellen präparierte microsomale ATPase hydrolysiert alle Nucleosidtri- und Diphosphate (19). Die ATPase von *Pseudomonas* spaltet ATP, ADP, AMP und ITP (26), während die ATPasen aus *S. faecalis* (22) und *Bac. Megaterium* (28) praktisch nur ATP und ADP spalten.

Metallspezifität der Coli-ATPase

Die Aktivität der ATPase-Präparation von Wildtyp B 163 und Mutante B 525 wird durch Waschen mit 20 mmol. EDTA stark herabgesetzt (s. Tabelle 3). Durch EDTA konnte auch die Aktivität der ATPase von *Bac. Megaterium* fast völlig gehemmt werden (28).

Die durch EDTA bewirkte Hemmung der ATPase-Aktivität wurde durch Zugabe verschiedener 2-wertiger Metallionen teilweise wieder aufgehoben, wobei Mg^{++} am wirksamsten war.

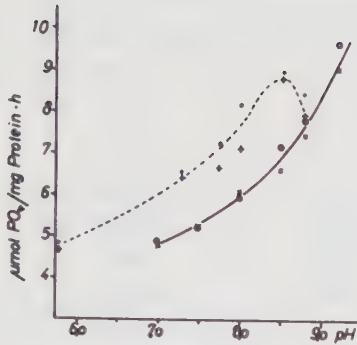


Abb. 4:

ATPase-Aktivität als Funktion des pH.

$[ATP] = 5 \text{ mMol}$, $[Mg^{++}] = 5 \text{ mMol/l}$, $[Na^+] = 100 \text{ mMol/l}$, $[K^+] = 100 \text{ mMol/l}$
 Inkubation 20 Min. bei $T = 30^\circ \text{ C}$.

x = *E. coli* B 163

o = *E. coli* B 525

— = ATPase-Präparation, - - - - - = intakte Bakterien

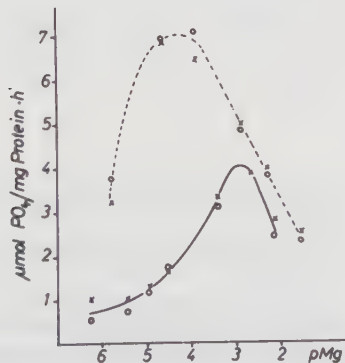


Abb. 5:

Wirkung der Mg-Konzentration auf die ATPase-Aktivität.

$[ATP] = 5 \text{ mMol}$, $[Na^+] = 20 \text{ mMol/l}$, $[K^+] = 100 \text{ mMol/l}$

Inkubationszeit 20 Min. bei $T = 30^\circ \text{ C}$.

x = *E. coli* B 163

o = *E. coli* B 525

- - - - - ATPase-Präparation, — = intakte Bakterien

Metallzusatz	$\mu\text{Mol PO}_4 / \text{mg Protein} \cdot \text{h}$	
	E. coli B 163	E. coli B 525
Kontrolle + Mg^{++} (ohne EDTA)	4,80	4,65
nach Waschen mit EDTA	0,20	0,17
Mg^{++}	1,62	1,60
Mn^{++}	1,03	0,87
Ni^{++}	0,70	0,83
Ca^{++}	0,56	0,30

Tabelle 3: Metallspezifität der ATPase

Die ATPase-Präparationen wurden 1 mal mit 20 mmol EDTA und anschließend mehrmals mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

Inkubation: 60 Min. bei 30°C , Metallkonzentration jeweils 1 mMol. ATP = 3 mMol., Tris-Puffer 0,1 M pH 7,5.

Proteinkonzentration: B 163 = 200 γ / ml,
B 525 = 187 γ / ml.

Wirkung von Na und K auf die Aktivität der Coli-ATPase-Präparation

Da von mehreren Autoren ein Zusammenhang zwischen der durch Na und K aktivierbaren Komponente der Membran-ATPase und dem aktiven Na- und K-Transport wahrscheinlich gemacht werden konnte (16, 18, 29, 30), untersuchten wir die Aktivität der Coli-ATPase bei verschiedenen Na- und K-Konzentrationen.

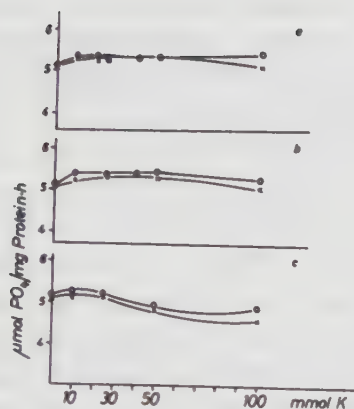


Abb. 6 (a - c):

ATPase-Aktivität als Funktion der $[K^+]$.

$[Mg-ATP] = 3 \text{ mMol/l}$, Inkubationszeit 20 Min. bei $T = 30^\circ \text{ C}$.

6 a: $Na = \emptyset$ 6 b: $[Na^+] = 20 \text{ mMol/l}$ 6 c: $[Na^+] = 100 \text{ mMol/l}$

x = E. coli B 163

o = E. coli B 525

Aus Abbildung 6 (a-c) geht hervor, daß zunehmende K-Konzentrationen bei konstanten vorgegebenen Na-Konzentrationen von 0 (6 a), 20 (6 b) und 100 mMol/l (6 c) keinen Einfluß auf die Aktivität der ATPase-Präparationen von E. coli B 163 und E. coli B 525 haben.

Dagegen findet sich mit zunehmender Na-Konzentration ein Optimum der ATPase-Aktivität. Es liegt in Abwesenheit von K bei 30 mMol/l Na (Abb. 7 a), bei einer K-Konzentration von 100 mMol/l beträgt die optimale Na-Konzentration etwa 20 mMol/l (Abb. 7 b). Die Zunahme der ATPase-Aktivität im Optimum beträgt etwa 20 %. Vergleichbare Untersuchungen bei Bac. Megaterium zeigten keinen Einfluß von Na- und K auf die Aktivität der Membran-ATPase (28).

Einfluß von g-Strophanthin auf die Aktivität der Coli-ATPase-Präparation

Nach Schatzmann (31) kann der aktive Transport von Na- und K bei menschlichen Erythrocyten durch g-Strophanthin gehemmt werden. Untersuchungen an Erythrocyten (18, 32, 33), Nervenfasern (29), Gehirn- und Nierenzellen (34) ergaben, daß nur der durch Na und K aktivierbare Anteil der ATPase-Aktivität durch g-Strophanthin gehemmt werden kann, nicht jedoch die durch Mg^{++} allein aktivierte Komponente der ATPase.

Die Aktivität der ATPase von E. coli B 163 und E. coli B 525 wurde durch g-Strophanthin in Konzentrationen bis zu 2×10^{-3} Mol/l nicht gehemmt (s. Tab. 4).

g-Strophanthin	$\mu\text{Mol PO}_4 / \text{mg Protein} \cdot \text{h}$ E. coli B 163	$\mu\text{Mol PO}_4 / \text{mg Protein} \cdot \text{h}$ E. coli B 525
0	5,56	5,56
1×10^{-6}	5,51	5,67
1×10^{-5}	5,56	5,56
1×10^{-4}	5,45	5,56
1×10^{-3}	5,67	5,62
2×10^{-3}	5,56	5,67

Tabelle 4: Einfluß von g-Strophanthin auf die Aktivität der ATPase-Präparation

$[ATP] : 3 \text{ mMol/l}$ $[Mg^{++}] : 3 \text{ mMol/l}$ $[Na^+] : 20 \text{ mMol/l}$
 $[K^+] : 20 \text{ mMol/l}$

pH : 7,5, Inkubation: 20 Min. bei 30° C

Protein-Konzentration: B 163 = 290 γ / ml

B 525 = 290 γ / ml

Solomon (35) konnte die durch 0,1 m KCl bewirkte 20 %ige Aktivitätssteigerung der Coli-ATPase durch Zugabe von 5×10^{-3} m g-Strophanthin wieder aufheben. Bei ATPase-Präparationen von ebenfalls gram-negativen Pseudomonas- und Cytophaga-Bakterien (26) wurde durch Zugabe von K, Na, NH_4 und Li in Konzentrationen von 0,1 - 0,4 m eine bis zu 100 %ige Aktivitätssteigerung der ATPase erreicht, die durch g-Strophanthin bis zu 3×10^{-4} m nicht verhindert werden konnte.

ATPase von intakten E. coli B 163 und E. coli B 525

Im Gegensatz zu den ATPase-Präparationen zeigte die ATPase der intakten Coli-Zellen ein deutliches Optimum der Aktivität bei pH 8,5 (Abb. 4, unterbrochene Linie).

Die optimale Mg^{++} -Konzentration betrug 10^{-3} m (Abb. 4, durchgezogene Linie).

K^+ hat, wie bei den ATPase-Präparationen, auf die ATPase von intakten Bakterien keinen Einfluß. Bei einer Na-Konzentration von etwa 30 mMol/l wurde die ATPase-Aktivität bei intakten Zellen um 20 % erhöht (Abb. 8).

Auch bei den intakten Bakterien des Wildtyps B 163 und der K-Mangelmutante B 525 ließ sich kein Unterschied in der ATPase-Aktivität nachweisen. Neben der durch Strophanthin hemmbaren ATPase kommt in höheren Zellen noch die latente, durch 2,4DNP aktivierbare mitochondriale ATPase vor (28). Zur weiteren Charakterisierung der Coli-ATPase wurde deshalb der Einfluß von 2,4 DNP untersucht.

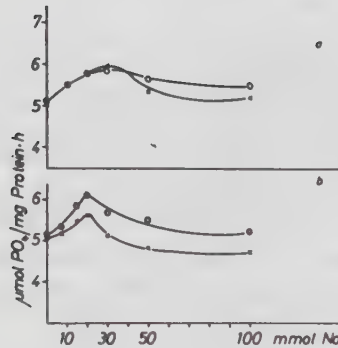


Abb. 7 (a + b):

ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der $[\text{Na}^+]$.

$[\text{Mg-ATP}] = 3 \text{ mMol/l}$, Inkubation 20 Min. bei $T = 30^\circ \text{ C}$.

7 a : $\text{K} = \emptyset$

7 b : $[\text{K}^+] = 100 \text{ mMol/l}$

x = E. coli B 163

o = E. coli B 525

Es zeigte sich, daß 2,4 DNP in einer Konzentration von 1×10^{-4} m bei den intakten Coli-Bakterien eine Hemmung der ATPase-Aktivität um etwa 10 % bewirkt. Greenawalt et al. (28) fanden für die ATPase von Bac. Megaterium bei 10^{-4} m DNP eine Hemmung der Aktivität von 5 %. Die bakterielle ATPase ist also auch von der mitochondrialen ATPase verschieden.

DNP [m]	Aktivität in % der Kontrolle	
	E. coli B 163	E. coli B 525
0	100 %	100 %
10^{-6}	97,5	96
10^{-5}	90	90
10^{-4}	88	84
10^{-3}	83	78

Tabelle 5: Einfluß von 2,4-DNP auf die ATPase-Aktivität

[ATP]: 3 mMol/l [Mg⁺⁺]: 3 mMol/l [Na⁺]: 25 mMol/l
[K⁺]: 25 mMol/l in Tris 0,1 ml pH 7,5

Inkubation 20 Min. bei 30° C.

Einfluß von Desoxycholat auf die ATPase-Aktivität

Da die Coli-ATPase nur geringfügig durch Na aktiviert wurde, versuchten wir, die Coli-ATPase in eine Na- und K-aktivierbare Form zu überführen.

Järnefelt(36) konnte durch Behandlung mit DOC einen großen Teil der ATPase von Hirnmicrosomen von der nicht aktivierbaren in die durch Na- und K aktivierbare Form verwandeln. Abbildung 9 zeigt, daß sich bei intakten Bakterien bis zu einer DOC-Konzentration von 6 mg/ml die ATPase-Aktivität um das 5-fache erhöht. An einer durch Ultraschall gewonnenen Coli-ATPase-Präparation, die eine höhere spezifische

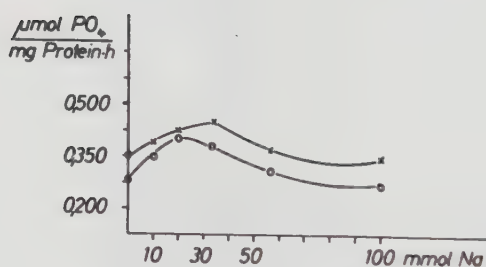


Abb. 8:

ATPase-Abhängigkeit bei intakten Bakterien in Abhängigkeit von der $[Na^+]$.

$[Mg-ATP] = 3 \text{ mMol/l}$, $K = \emptyset$, Inkubation 120 Min. bei $T = 30^\circ \text{ C}$.

x = E. coli B 163

o = E. coli B 525

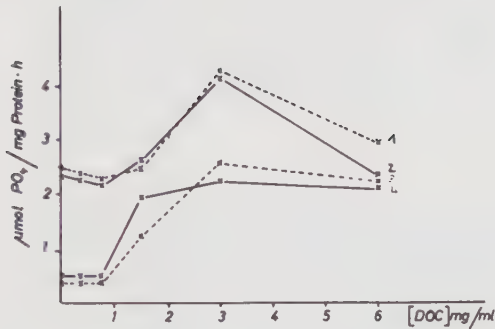


Abb. 9:

ATPase-Aktivität nach DOC-Vorbehandlung.

1 = E. coli B 163 wurden 10 Min. mit Ultraschall aufgeschlossen, dann mit DOC geschüttelt.

Kein Na und K im Ansatz.

2 = Vorbehandlung von E. coli B 163 wie unter 1.

$[Na^+]$ und $[K^+]$ im Versuchsansatz je 20 mMol/l.

3 = E. coli B 163 wurden 2 Std. bei Zimmertemperatur mit DOC geschüttelt. Kein Na und K im Ansatz.

4 = Vorbehandlung wie unter 3. $[Na^+]$ und $[K^+]$ je 20 mMol/l.

Aktivität als die intakten Zellen aufweist, konnte die ATPase-Aktivität durch Vorbehandlung mit 3 mg DOC/ml verdoppelt werden.

Weder bei den intakten Zellen noch bei der ATPase-Präparation konnte durch Zugabe von Na und K im Anschluß an die DOC-Vorbehandlung eine Steigerung der ATPase-Aktivität festgestellt werden. Durch DOC ist also keine Umwandlung in eine durch Na und K aktivierbare Form der ATPase erfolgt.

II. Aufnahme und Abgabe von $[K^+]$ und $[Na^+]$ bei E. coli B 163 und der K-Mangelmutante E. coli B 525

Abhängigkeit des intrazellulären K-Gehaltes bei E. coli B 163 und E. coli B 525 von der extrazellulären K-Konzentration

Bei den Untersuchungen der ATPasen von E. coli B 163 und E. coli B 525 konnten bei Wildtyp und Mutante keine unterschiedlichen Eigenschaften nachgewiesen werden. Es wurde deshalb weiter untersucht, ob die Mutation zu einem Ausfall des Alkali-Jonen-Transportmechanismus geführt hat.

Bei beiden Stämmen kann eine niedrige intrazelluläre K-Konzentration durch Waschen in bidestilliertem Wasser erreicht werden. Schon nach einmaligem Waschen ist der größte Teil des intrazellulären K entfernt (Abb. 10). Inkubiert man Bakterien, die über Nacht in K-reichem Nährmedium gewachsen sind, in verschiedenen Medien mit geringem K-Gehalt ($4 \times 10^{-4} M$), so stellt sich innerhalb weniger Minuten ein neues Gleichgewicht der intrazellulären K-Konzentration ein (Abb. 11). Bei den in K-armen, Na-reichen Medien inkubierten Zellen des Wildtyps zeigt sich eine nur geringfügige Abnahme des K-Gehaltes, während bei den Zellen der Mutante der K-Gehalt stark absinkt.

Auch bei K-armen Zellen, bei denen durch Waschen mit bidestilliertem Wasser der K-Gehalt stark erniedrigt wurde, stellt

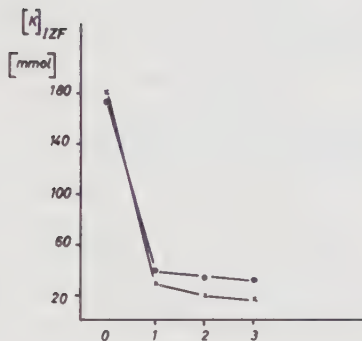


Abb. 10:

Intrazellulärer K-Gehalt nach Waschen mit bidestilliertem Wasser.

Ordinate : K_{IZF}
mit bidest. Wasser

Abszisse : 1,2 und 3maliges
Waschen

x = E. coli B 163

o = E. coli B 525

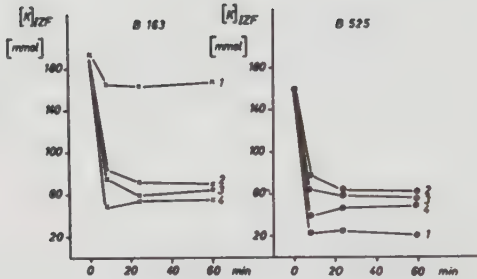


Abb. 11:

Intrazelluläre K-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 bei Inkubation in verschiedenen Medien. Über Nacht gewachsene Zellen mit hohem K-Gehalt wurden bei 37° in verschiedenen Medien (1-4) bei einer extrazellulären K-Konzentration von $4 \cdot 10^{-4}$ m inkubiert.

x = *E. coli* B 163 o = *E. coli* B 525

1 = Na-Medium [Glukose 0,5 %, NaCl 80 mMol/l, Na_2HPO_4 30 mMol/l, NaH_2PO_4 30 mMol/l, NH_4Cl 15 mMol/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mMol/l, MgCl_2 1 mMol/l]

2 = 0,3 m Rohrzuckerlösung

3 = 0,1 m Rohrzuckerlösung

4 = bidest. Wasser

sich nach Inkubation in Medien mit verschiedenen K-Konzentrationen schnell eine neue K-Gleichgewichtskonzentration ein (Abb. 12). Aus dieser Abbildung und aus Abbildung 13 geht hervor, daß die sich einstellende intrazelluläre K-Konzentration von der extrazellulären K-Konzentration abhängt, unabhängig davon, ob K-arme oder K-reiche Zellen inkubiert werden.

Auch bei der Mutante E. coli B 525 ist die intrazelluläre K-Konzentration immer höher als die extrazelluläre, es erfolgt eine Netto-Aufnahme von K gegen den Konzentrationsgradienten und damit ein aktiver Transport von K-Ionen.

Abhängigkeit des intrazellulären K-Gehaltes von E. coli B 163 und E. coli B 525 vom Stoffwechsel

Einfluß von Glukose auf die K-Aufnahme

Da ein Transport gegen den Konzentrationsgradienten stoffwechselabhängig ist, wurde der Einfluß von Glukose geprüft.

Befindet sich Glukose im Medium, so erreichen Wildtyp und Mutante eine hohe intrazelluläre K-Konzentration (Abb. 14 a und 14 b). Ohne Glukose nehmen nur die Zellen des Wildtyps (B 163) eine geringe Menge K auf, bei der Mutante (B 525) erfolgt keine K-Aufnahme. Schultz et al. (37) fanden bei E. coli ebenfalls eine starke Hemmung der K-Aufnahme in Abwesenheit von Glukose.

K-Aufnahme mit Glycerin als Substrat

Wird statt Glukose dem Medium Glycerin in einer Konzentration von 0,5 % zugegeben, so findet man, daß beim Wildtyp der intrazelluläre K-Gehalt etwas geringer ist als im Glukose-Medium. Die Mutante dagegen nimmt mit Glycerin kein K^+ auf. Die Mutante hat mit Glycerin die gleiche stark erniedrigte intrazelluläre K-Konzentration wie bei einer Inkubation in bidestilliertem Wasser oder in Na-Medium. Die durch

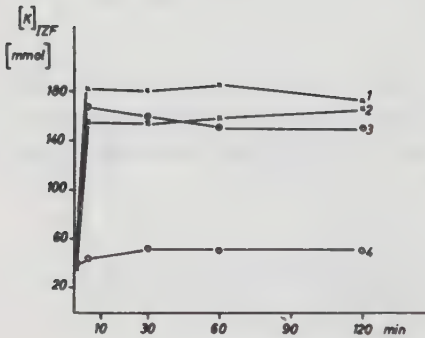


Abb. 12:

Intrazelluläre K-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 bei Inkubation in Medien mit verschiedenen extrazellulären K-Konzentrationen.

Über Nacht gewachsene Bakterien wurden 2 mal in bidest. Wasser gewaschen und verschieden lange in Na-Medium (s. Legende Abb. 11) bei 37° C. inkubiert.

- x_1 = *E. coli* B 163 bei $K_{EZF} = 40 \text{ mMol/l}$
- o_3 = *E. coli* B 525 bei $K_{EZF} = 40 \text{ mMol/l}$
- x_2 = *E. coli* B 163 bei $K_{EZF} = 1,5 \text{ mMol/l}$
- o_4 = *E. coli* B 525 bei $K_{EZF} = 1,5 \text{ mMol/l}$

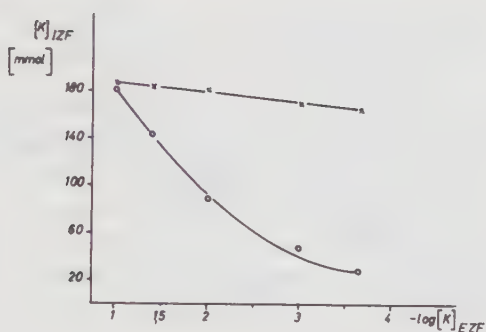


Abb. 13:

Intrazelluläre K-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 als Funktion der extrazellulären K-Konzentration.

Die Bakterien wurden 2 mal in bidest. Wasser gewaschen und 20' bei 37° C in Na-Medium (s. Legende Abb. 11) mit verschiedenem K-Gehalt inkubiert.

x = *E. coli* B 163

o = *E. coli* B 525

Glycerin bewirkte K-Aufnahme beim Wildtyp läßt sich durch 2,4 DNP hemmen, man findet dann auch bei E. coli B 163 einen erheblich erniedrigten intrazellulären K-Gehalt.

In Übereinstimmung mit der fehlenden K-Aufnahme mit Glycerin als Substrat zeigte sich, daß auch das Wachstum von E. coli B 163 mit Glycerin stark verlangsamt war, außerdem war der O₂-Verbrauch geringer als beim Wildtyp E. coli B 163 (38).

Einfluß von Stoffwechselinhibitoren auf den intrazellulären K-Gehalt von E. coli B 163 und E. coli B 525

Zur weiteren Charakterisierung der stoffwechselabhängigen K-Aufnahme wurde die Wirkung verschiedener Stoffwechselinhibitoren auf den intrazellulären K-Gehalt von Wildtyp und Mutante untersucht. Die Abbildungen 14 a und b zeigen, daß 2,4-DNP in Abhängigkeit vom Substrat (Glukose bzw. Glycerin) die K-Aufnahme verschieden stark hemmt. Mit Glukose als Substrat wird die K-Aufnahme der Mutante durch 2,4-DNP stärker herabgesetzt als die des Wildtyps (Abb. 15).

Bei Versuchen mit verschiedenen Inhibitoren (KCN, NaF, NaN₃, Phloridzin, g-Strophanthin und 2,4-DNP) fand sich nur unter Einwirkung von 2,4-DNP ein stark erniedrigter intrazellulärer K-Gehalt (Tab. 6). Auch Schultz et al. (37) fanden eine sehr starke Hemmung des K-Einstroms in E. coli durch 2,4-DNP, während NaCN und NaF, wie bei unseren Versuchen, keine oder nur eine sehr geringe Wirkung zeigten.

Inhibitor	Inhibitor-konzentration	E. coli B 163		E. coli B 525	
		K _{IZF} mMol/l	K _{IZF} in % d. Kontrolle	K _{IZF} mMol/l	K _{IZF} in % d. Kontr.
Kontrolle	Ø	196	100	147	100
DNP	1 x 10 ⁻³ m	109	55	28	19
NaN ₃	"	168	86	128	87
Diamox	"	172	88	139	94
g-Strophanthin	"	174	89	150	102
NaJ	"	190	97	150	102
KCN	"	200	102	150	102

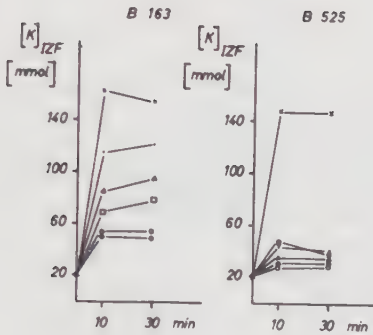


Abb 14 a:

Intrazelluläre K-Konzentration von E. coli B 163 und E. coli B 525 in Abhängigkeit vom Stoffwechsel.

Über Nacht gewachsene Bakterien wurden 2 mal mit bidest. Wasser gewaschen und bei 37° C in Na-Medium (s. Legende Abb 11) bzw. KCl-Lösung inkubiert. K_{EZF} beträgt jeweils 40 mMol/l.

- x = Na-Medium + Glukose 0,5 %
- = Na-Medium + Glukose + 2,4 DNP ($1 \times 10^{-3}m$)
- = Na-Medium + Glycerin 0,5 %
- o = Na-Medium + Glycerin + 2,4 DNP ($1 \times 10^{-3}m$)
- △ = KCl-Lösung
- ◉ = KCl-Lösung + 2,4 DNP ($1 \times 10^{-3}m$)

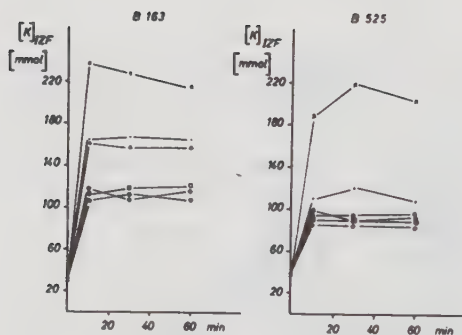


Abb. 14 b:

Intrazelluläre K-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 in Abhängigkeit vom Stoffwechsel.

Versuchsbedingungen wie unter Abb.14 a. Die K-Konzentration der Medien war 100 mMol/l statt 40 mMol/l.

Tabelle 6: Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf die intrazelluläre K-Konzentration von E. coli B 163 und E. coli B 525.

Bakterien zweimal in bidestilliertem Wasser gewaschen.

Inkubation: 30 Min. bei 37° C in Na-Medium
(s. Legende Abb. 11) mit $[K^+]_{EZF} =$
40 mMol/l

Abhängigkeit der intrazellulären Na- und K-Konzentration von E. coli B 163 und E. coli B 525 vom pH.

Wie die bisherigen Versuche gezeigt haben, wird auch bei der Mutante K aktiv in die Zelle transportiert. Schultz et al. (39) fanden bei Versuchen an E. coli, daß der K-Einstrom in die Bakterienzelle größer ist als der Na-Ausstrom. Sie konnten nachweisen, daß zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität neben Na^+ auch H^+ im Austausch gegen K^+ aus der Zelle gelangt.

Es wurde deshalb die intrazelluläre K- und Na-Konzentration in E. coli B 163 und B 525 in Abhängigkeit vom pH bestimmt. Zunehmende H^+ -Konzentration hemmt bei hoher extrazellulärer K-Konzentration (40 mMol) die K-Aufnahme in Wildtyp und Mutante gleich stark (Abb. 16). Bei niedriger extrazellulärer K-Konzentration (0,5 mMol/l) und verschiedenen extrazellulären Na-Konzentrationen findet sich dagegen ein entgegengesetztes Verhalten der beiden Stämme hinsichtlich des Na- und K-Gehaltes. Die intrazelluläre K-Konzentration der Mutante bleibt über den gesamten untersuchten pH-Bereich auf einem etwa konstant niederen Wert von 40 mMol, während die intrazelluläre Na-Konzentration mit abnehmender H^+ -Konzentration größer wird. Der Wildtyp dagegen zeigt auch bei niedriger extrazellulärer K-Konzentration eine Abnahme des intrazellulären K mit zunehmender H-Konzentration, während der intrazelluläre Na-Gehalt konstant bleibt oder mit größer werdendem pH geringfügig zunimmt. Na und K verhalten sich also bei E. coli B 163 und E. coli B 525 entgegengesetzt.

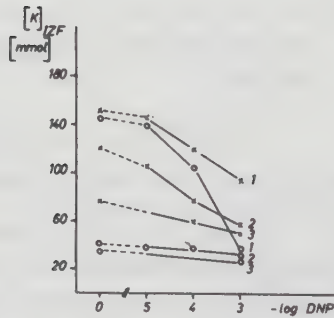


Abb. 15:

Intrazelluläre K-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 als Funktion der extrazellulären 2,4-Dinitrophenol-Konzentration.

Die Bakterien wurden 1 mal in bidest. Wasser gewaschen und 10' bei 37° C. in Na-Medium (s. Legende Abb. 11) bzw. KCl-Lösung mit einer extrazellulären K-Konzentration von jeweils 40 mMol/l inkubiert.

- x = *E. coli* B 163 o = *E. coli* B 525
1 = Na-Medium + Glukose 0,5 %
2 = Na-Medium + Glycerin 0,5 %
3 = KCl-Lösung

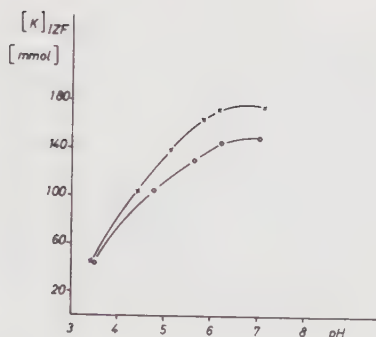


Abb.16:

Einfluß von $[H^+]$ auf die intrazelluläre K-Konzentration von E. coli B 163 und E. coli B 525.

Über Nacht gewachsene Bakterien mit hohem K-Gehalt wurden 10' bei 37° C. inkubiert.

Inkubationsmedium: $[KCl\ 40\ mMol/l,\ MgCl_2\ 1\ mMol/l,$
 $NH_4Cl\ 15\ mMol/l,\ Glukose\ 0,5\ \%,$
 $0,03\ m\ Barbital-Na-Acetatpuffer]$

x = E. coli B 163

o = E. coli B 525

(Mittelwert von 3 Versuchen)

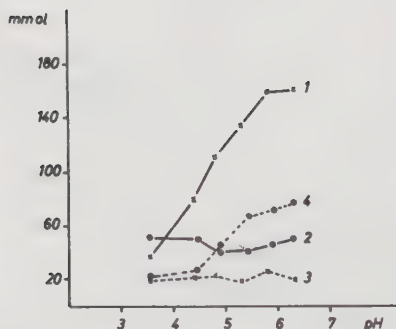


Abb. 17 a:

Intrazelluläre K- und Na-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 in Abhängigkeit vom pH.

Bakterien mit hohem K-Gehalt wurden 10' bei 37° C. in Na-Medium (s. Legende Abb. 11) inkubiert. Der Na-Gehalt wurde gegen Cholin bis auf 45 mMol/l ausgetauscht. Außerdem 0,05 m Citratpuffer (Sörensen). Die jeweiligen pH-Werte wurden durch Titration eingestellt. $[K]_{EZF}$ jeweils 0,04 mMol/l

x = *E. coli* B 163

o = *E. coli* B 525

1 = K_{IZF} bei *E. coli* B 163

3 = Na_{IZF} bei *E. coli* B 163

2 = K_{IZF} bei *E. coli* B 525

4 = Na_{IZF} bei *E. coli* B 525

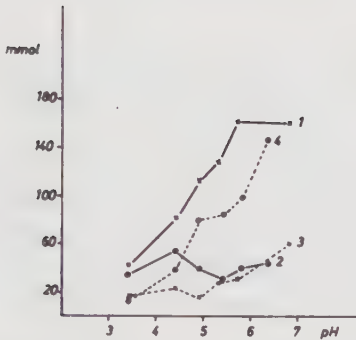


Abb. 17 b:

Intrazelluläre K- und Na-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 bei verschiedenen pH-Werten.

Versuchsbedingungen wie unter Abb.17 a. Die extrazelluläre Na-Konzentration betrug 75 mMol/l statt 45 mMol/l.

Intrazellulärer Na- und K-Gehalt von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 bei verschiedenen extrazellulären Na- und K-Konzentrationen

Um das entgegengesetzte Verhalten von Na- und K bei beiden Stämmen zu erklären, wurde der intrazelluläre Na- und K-Gehalt in Abhängigkeit von der extrazellulären Na- und K-Konzentration untersucht.

Kurve 1 und 3 in Abbildung 18 zeigen einen deutlichen Unterschied des K-Gehaltes von Wildtyp (B 163) und der Mutante (B 525) bei niedriger extrazellulärer K-Konzentration, während sich bei hoher extrazellulärer K-Konzentration der intrazelluläre K-Gehalt beider Stämme annähert. Werden die Bakterien in einem Medium mit hohem Na-Gehalt inkubiert (Abb. 18, Kurve 2 und 4), so findet man bei der Mutante eine starke Erniedrigung des K-Gehaltes.

Inkubiert man die Zellen in Na-freier Lösung, so haben Wildtyp und Mutante auch bei niedriger extrazellulärer K-Konzentration annähernd denselben intrazellulären K-Gehalt. Mit zunehmender extrazellulärer Na-Konzentration sinkt der intrazelluläre K-Gehalt bei *E. coli* B 525 jedoch erheblich ab, der K-Gehalt von *E. coli* B 163 wird dagegen etwas größer (Abb. 19).

Bei der Mutante hat also eine Erhöhung der extrazellulären Na-Konzentration eine Erniedrigung des intrazellulären K-Gehaltes zur Folge. Die, im Gegensatz zum Wildtyp, enge Kopplung von Na- und K-Gehalt bei der Mutante geht auch aus Abbildung 20 hervor. Wird nämlich die extrazelluläre K-Konzentration im Medium erhöht, so erniedrigt sich bei der Mutante der intrazelluläre Na-Gehalt.

Beim Wildtyp nimmt der Na-Gehalt mit steigender extrazellulärer Na-Konzentration unabhängig von der extrazellulären K-Konzentration linear zu (Abb. 21). Bei der Mutante zeigt sich nur bei hoher extrazellulärer K-Konzentration (Abb. 21,3)

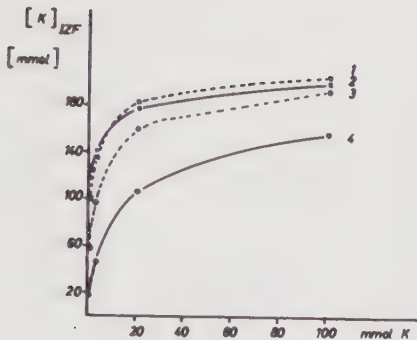


Abb. 18:

Intrazelluläre K-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 in Abhängigkeit von der extrazellulären K-Konzentration.

Die Bakterien wurden 1 x mit bidest. Wasser gewaschen und 10' bei 37° C inkubiert.

x = *E. coli* B 163

o = *E. coli* B 525

2,4 ——— = Inkubation in 150 mMol NaCl mit zunehmender KCl-Konzentration.

1,3 ----- = Inkubation in 150 mMol Cholinchlorid mit zunehmender KCl-Konzentration.

Es wurde mit Cholinchlorid jeweils die gleiche Ionenstärke eingestellt. Die Medien enthielten außerdem 0,5 % Glukose und 0,1 m Trispuffer pH 7,4.

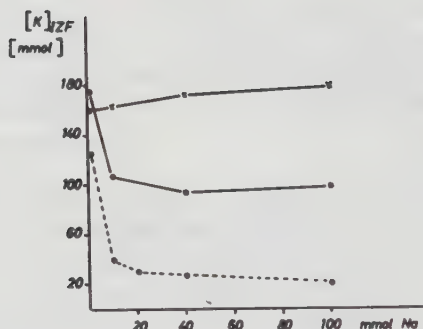


Abb. 19:

Intrazelluläre K-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 als Funktion der extrazellulären Na-Konzentration. Die Bakterien wurden 1 mal mit bidest. Wasser gewaschen und 10' bei 37° C. inkubiert.

x = *E. coli* B 163

o = *E. coli* B 525

———— = $[K]_{EZF}^{40}$ mMol/l und steigende Na-Konzentration

----- = $[K]_{EZF}^{0,35}$ mMol/l und steigende Na-Konzentration

Es wurde mit Cholinchlorid eine konstante Ionenstärke eingestellt. Die Medien enthielten außerdem 0,5 % Glukose und 0,1 m Trispuffer pH 7,4.

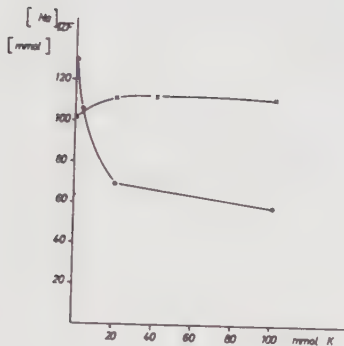


Abb. 20:

Intrazelluläre Na-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 in Abhängigkeit von der extrazellulären K-Konzentration.

Die Bakterien wurden 1 mal mit bidest. Wasser gewaschen und 10' bei 37° C. inkubiert in:

[NaCl 135 mMol/l, NH_4Cl 10 mMol/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mMol/l, Na_2HPO_4 5 mMol/l, NaH_2PO_4 5 mMol/l, Glukose 0,5 %]

Zunehmende Konzentrationen von KCl mit Cholinchlorid auf gleiche Ionenstärke kompensiert.

x = *E. coli* B 163

o = *E. coli* B 525

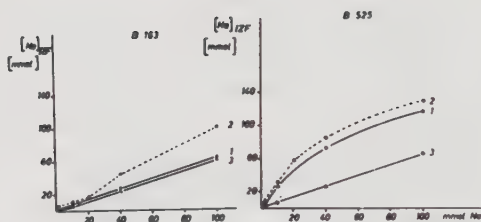


Abb. 21:

Intrazelluläre Na-Konzentration von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 als Funktion der extrazellulären Na-Konzentration.

Die Bakterien wurden 1 x mit bidest. Wasser gewaschen und 10' bei 37° C inkubiert.

Glukose 0,5 %, 0,1 m Trispuffer pH 7,4.

Zunehmende NaCl-Konzentrationen wurden mit Cholinchlorid auf konstante Ionenstärke eingestellt.

x_1 = *E. coli* B 163, K^+_{EZF} 0,02 mMol/l, $\emptyset$ Dinitrophenol

x_2 = *E. coli* B 163, K^+_{EZF} 0,18 mMol/l + Dinitrophenol 1 mMol/l

x_3 = *E. coli* B 163, K^+_{EZF} 40 mMol/l, $\emptyset$ Dinitrophenol

o_1 = *E. coli* B 525, K^+_{EZF} 0,17 mMol/l, $\emptyset$ Dinitrophenol

o_2 = *E. coli* B 525, K^+_{EZF} 0,18 mMol/l + Dinitrophenol 1 mMol/l

o_3 = *E. coli* B 525, K^+_{EZF} 40 mMol/l, $\emptyset$ Dinitrophenol

ein linearer Anstieg des Na-Gehaltes, bei niedriger extrazellulärer K-Konzentration nimmt er mit steigender extrazellulärer Na-Konzentration viel stärker zu (Abb. 21,1).

Einen weiteren Anstieg des intrazellulären Na-Gehaltes bei Wildtyp und Mutante erhält man durch Zugabe von 1×10^{-3} Mol 2,4-DNP (Abb. 21,2). Na kann also nur passiv in die Zelle gelangen.

Diskussion

Es handelt sich bei den untersuchten Enzympräparationen von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 um eine ATPase. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß beide Stämme in einem Nährmedium bei einer Phosphatkonzentration von 60 mMol/l gezüchtet wurden. Bei dieser Phosphatkonzentration ist die alkalische Phosphatase von *E. coli* vollständig reprimiert (40). Auch die saure Coli-Phosphatase und die auf der Oberfläche lokalisierte Nucleotidase, deren pH-Optima bei pH 5,5-pH 6 liegen (41), können nicht mit dem von uns getesteten Enzym identisch sein, da alle Versuche bei pH 7,5 durchgeführt wurden.

Bei einer Beteiligung der ATPase am aktiven Jonentransport bei *E. coli* müßte das Vorhandensein des Enzyms in der Zellmembran gefordert werden. Voelz (42) konnte die Lokalisation der ATPase in der Cytoplasma-Membran und im Zell-Wall von *E. coli* histochemisch nachweisen.

Die Beteiligung der ATPase am Jonentransport ist jedoch nicht sicher. Während Solomon, der in seinen Versuchen bei einer Konzentration von 100 mMol/l KCl die Aktivität der Coli-ATPase um 20 % steigern und diese Steigerung durch 5×10^{-3} m Strophanthin wieder rückgängig machen konnte (35), eine Beteiligung der ATPase am aktiven K-Transport bei *E. coli* annimmt, lehnen andere Autoren einen Einfluß der bakteriellen ATPase auf den Jonentransport ab. Drapeau et al. (26) fanden bei *Cytophaga*- und *Pseudomonas*-Bakterien keine Aktivierung durch Na und K und keine Hemmung der ATPase-Aktivität durch Strophanthin. Auch für *Bac. Megaterium* wird eine Beteiligung der ATPase am Na-K-Transport ausgeschlossen, da durch Zugabe von Na und K keine Aktivitätssteigerung der ATPase erreicht werden konnte (28). In diesem Falle könnte die fehlende Aktivierung der ATPase durch die großen Konzentrationsunterschiede der geprüften Na- und K-Konzentrationen bedingt sein, da unsere Ergebnisse an

E. coli gezeigt haben, daß die Coli-ATPase nur in einem eng begrenzten Konzentrationsbereich durch Na aktiviert wird.

Im Gegensatz zur starken Aktivierbarkeit der ATPase von Erythrocyten und Nervenfasern durch Na und K (17, 18, 19, 43), ist die an *E. coli* gefundene Erhöhung der ATPase-Aktivität durch Na sehr gering, Zugabe von K brachte keinerlei Beeinflussung der ATPase-Aktivität. Die durch Na erhaltene geringe Aktivierung der Coli-ATPase konnte im Unterschied zu Befunden an Hirnmicrosomen (36) auch durch eine DOC-Vorbehandlung nicht vergrößert werden, was an der größeren Festigkeit der Bakterienmembran liegen könnte. Die fehlende bzw. erst durch eine sehr hohe Strophanthinkonzentration (35) erreichte Hemmung der ATPase-Aktivität bei Bakterien zeigt ebenfalls die Verschiedenheit der bakteriellen ATPase gegenüber der tierischen. Die tierische ATPase benötigt zu ihrer Aktivierung die gleichzeitige Anwesenheit von Na und K.

Als wichtigste Aussage der Versuche mit den ATPase-Präparationen von *E. coli* B 163 und *E. coli* B 525 ergibt sich, daß bei allen untersuchten Parametern die ATPase des Wildtyps und die ATPase der K-Mangelmutante sich praktisch gleich verhielten. Hieraus, wie auch aus der fehlenden Hemmung der ATPase-Aktivität durch Strophanthin, kann jedoch eine Beteiligung der ATPase am Jonentransport bei Bakterien nicht ausgeschlossen werden. Denn auch die K-Mangelmutante *E. coli* B 525 kann, wie die weiteren Untersuchungen ergeben haben, K stoffwechselabhängig gegen einen Konzentrationsgradienten in die Zelle aufnehmen, d. h. es erfolgt auch bei der Mutante ein aktiver Transport von K in die Zelle.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß K im Zellinnern von *E. coli* in gebundener Form vorliegt, wie es für den intrazellulären K-Gehalt von *Alcaligenes faecalis* vermutet wird (44). Der fragliche Komplexbildner müßte in einer Konzentration von ca. 2×10^{-1} m im Zellinnern von *E. coli* vor-

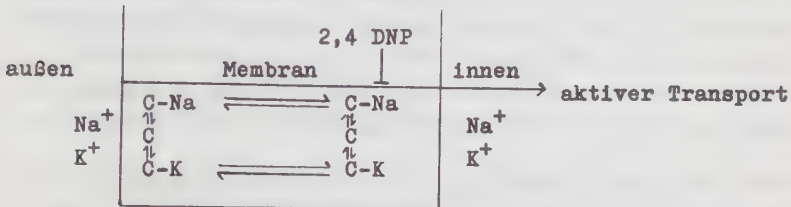
handen sein, 99 % der intrazellulären K-Konzentration von etwa 200 mMol müßten dann gebunden sein (37). Wie die Versuche über die Änderung des intrazellulären K-Gehaltes unter Glukosemangel und in Anwesenheit von DNP erkennen lassen, müßte dann auch die K-Bindung im Zellinnern von *E. coli* unter Stoffwechselkontrolle stehen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß das intrazelluläre K bei *E. coli* in einer osmotisch aktiven Form vorliegt (45). Aus diesen Gründen darf für die unterschiedliche Verteilung des K zwischen der Bakterienzelle und ihrem Medium ein aktiver Transportmechanismus angenommen werden.

Es wäre möglich, daß die K-Aufnahme bei *E. coli* B 525 durch die Mutation so verändert wurde, daß der aktive Transport nur noch bei hohen extrazellulären K-Konzentrationen erfolgt. Aus *Neurospora-crassa* konnte eine solche Mutante isoliert werden (46), bei der die Aufnahme von ^{42}K geringer war als beim Wildtyp. Dagegen fanden Lubochinsky et al. (47), die ebenfalls die K-Aufnahme bei *E. coli* B 163 und *E. coli* B 207 (der gleichen Mutante wie *E. coli* B 525, jedoch Streptomycin-resistent) untersuchten, daß die ^{42}K -Aufnahme bei der Mutante größer war als beim Wildtyp. Es ist also bei *E. coli* B 525 nicht der aktive K-Transport in die Zelle mutiert. Hieraus kann gefolgert werden, daß die Mutation eine Erhöhung des K-Austritts aus der Zelle bewirkt hat.

Aus den Versuchsergebnissen läßt sich eine enge Kopplung von Na und K bei der Mutante erkennen. Die Erhöhung des K-Austritts bei der Mutante kann also nicht nur durch eine erhöhte Diffusion des K aus der Zelle bedingt sein.

Die Versuchsergebnisse lassen sich erklären, wenn man annimmt, daß es bei *E. coli* eine Carrier-bedingte Diffusion von K aus der Zelle gibt, und daß der Carrier durch die Mutation eine höhere Affinität für K bekommen hat und nun gleichzeitig mit Na reagiert.

Inzwischen machten Harold et al. (48) die gleiche Annahme, um ihre Ergebnisse an einer K-Mangelmutante von *S. faecalis* zu interpretieren. Auf die mögliche Existenz eines K-Efflux-Carriers für normale Zellen von *E. coli* wurde auch von Epstein et al. (49) hingewiesen.



Anhand des Schemas lassen sich die bei der Mutante *E. coli* B 525 gefundenen Ergebnisse folgendermaßen deuten:

Wird die Mutante in einem K-armen, Na-reichen Medium inkubiert, so gelangt Na über den mutierten Carrier nach innen und K verstärkt nach außen, da mehr Carrier-Moleküle in Form von C-Na ins Zellinnere kommen. Dadurch wird bei der Mutante mit zunehmender extrazellulärer Na-Konzentration bei konstanter extrazellulärer K-Konzentration der intrazelluläre K-Gehalt geringer. Im umgekehrten Fall sinkt mit zunehmender extrazellulärer K-Konzentration und konstanter extrazellulärer Na-Konzentration der intrazelluläre Na-Gehalt. Bei der Mutante konkurrieren demnach K und Na um den gleichen Carrier. Na hat jedoch keinen Einfluß bei hoher extrazellulärer K-Konzentration, da die Affinität des Carriers für K größer ist.

Der Carrier ist dissoziabel. Mit abnehmender extrazellulärer H^+ wird er freigesetzt, dadurch können bei der Mutante mit abnehmender H^+ bei niedriger extrazellulärer K-Konzentration steigende Mengen Na in die Zelle gelangen.

Die Ursache für die größere Abnahme des intrazellulären K-Gehaltes der Mutante bei Hemmung des aktiven Transports durch 2,4 DNP könnte darin liegen, daß DNP den K-Eintritt in die Zelle hemmt und nun das intrazelluläre K über den mutierten Carrier schnell nach außen gelangt. Der schnellere Anstieg der spezifischen Aktivität von ^{42}K bei der Mutante (47) kann ebenfalls durch den rascher erfolgenden K-Austritt aus der Zelle bedingt sein. Außerdem könnte auch ein Teil des ^{42}K über den mutierten Carrier gegen inaktives intrazelluläres K ausgetauscht worden sein.

Auch für andere Substanzen wird von mehreren Untersuchern ein durch Carrier vermittelter Austrittsmechanismus bei *E. coli* diskutiert, so für Galaktose (50), Glukose (51) und Galaktosid (52).

Material und Methoden

Die Versuche wurden mit dem Wildtyp *E. coli* B 163 und der von Lubin und Kessel (12) isolierten K-Mangel-Mutante *E. coli* B 525 durchgeführt. Beide Stämme sind Streptomycin sensitiv und wachsen nur in Gegenwart der Aminosäuren Leucin, Methionin und Histidin.

Die Bakterien wurden steril auf Schrägagarröhrchen verimpft und für die einzelnen Versuche bei 4° C aufbewahrt.

Zusammensetzung und Herstellung des Nährbodens

Agar	15 g	Wir ließen den Agar in
K ₂ HPO ₄	7 g	1000 ml aqua bidest 2
KH ₂ PO ₄	3 g	Stunden quellen. Nach
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g	Zugabe der Substanzen
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g	wurde solange im Wasser-
Glucose	2 g	bad gekocht, bis der
Na ₃ Citrat	0,5 g	Agar keine Trübung mehr
Casein-		zeigte. Anschließend
hydrolysat	1 g	wurde der Nährboden 30
Hefeextrakt	1 g	Min. bei 120° C im Auto-
L-Leucin	100 mg	klaven sterilisiert.
L-Methionin	100 mg	
L-Histidin	100 mg	

Züchtung der Bakterien

Die Bakterien wurden mit Nährmedium vom Schrägagar abgeschwemmt und in 3 l Nährmedium in Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37° C durch Glasfritten mit einem Gemisch von 95 % O₂ - 5 % CO₂ begast.

Zusammensetzung des Nährmediums

NaCl	80 mMol/l
KCl	30 mMol/l
MgCl ₂	1 mMol/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mMol/l
NH ₄ Cl	15 mMol/l
K ₂ HPO ₄	30 mMol/l
KH ₂ PO ₄	30 mMol/l
Glucose	0,5 %
L-Leucin	100 mg/l Medium
L-Methionin	100 mg/l Medium
L-Histidin	100 mg/l Medium

Präparation der ATPase

Die Präparation der ATPase erfolgte nach der von Abrams et al. (22) angegebenen Methode. Die über Nacht gewachsenen Zellen wurden 10 Min. bei 10.000 g in einer Servall-Zentrifuge abgetrennt. Die sedimentierten Bakterien wurden 3 x in kaltem bidestilliertem Wasser gewaschen. Darauf wurden die Zellen 120 Min. bei 38° C in 0,4 m Rohrzuckerlösung, die mit 0,15 m Tris pH 6,4 gepuffert war und Lysozym (180 γ/ml) enthielt, inkubiert. Durch Zentrifugieren wurden die entstandenen Protoplasten abgetrennt und durch starkes Schütteln während 30 Min. in hypotonem 0,02 m Trispuffer pH 6,4 bei 4° C lysiert. Im Phasenkontrastmikroskop wurde das Ausmaß der Lyse kontrolliert. Durch 15 Min. Zentrifugieren in der Spinco-Ultrazentrifuge bei 35.000 g und 0° C wurden die Membranbruchstücke abgetrennt und anschließend noch 2 mal in kalter 10⁻³ m MgSO₄ - Lösung gewaschen. Das in bidestilliertem Wasser suspendierte Sediment wurde in mehreren Portionen eingefroren und bei -25° C aufbewahrt.

Reinheit der ATPase-Präparation

Bei der Prüfung im Phasenkontrastmikroskop waren nur noch etwa 5 % Protoplasten sichtbar.

Testung der ATPase

In spitze Zentrifugengläser wurden pipettiert:

0,2 ml ATP (9 mg/ml Adenosin-5-triphosphat $\cdot$ $\text{NA}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
in Puffer, Endkonzentration 3 mmol.)

0,2 ml Mg^{++} (in Tris 0,1 m pH 7,5, Endkonzentration 3 mmol.)

0,5 ml Tris (0,1 m pH 7,5)

Nach Temperatúrausgleich im Wasserbad von 30° C
wurde die Reaktion durch Zugabe von

0,1 ml Enzympräparation gestartet.

Die Ansätze wurden 20 Min. bei 30° C unter mehrmaligem Umschütteln inkubiert. Durch Fällung des Proteins mit 0,5 ml 15 %iger kalter TCE wurde die Reaktion abgestoppt.

Phosphatbestimmung

Nach der Zentrifugation wurden zur Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphats nach Fiske und Subbarow (23) 2 mal je 0,5 ml des Überstandes zu Doppelbestimmungen abgenommen. Es wurden 0,4 ml 10 n H_2SO_4 , 0,8 ml 2,5 % Na_2MoO_4 , 0,4 ml des Fiske-Reagens zugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. 30 Min. nach Zugabe des Fiske-Reagens wurde die Extinktion in 1 cm Küvetten bei 578 m μ im Eppendorf-Photometer gemessen.

Proteinbestimmung

Der TCE-Niederschlag wurde durch Erhitzen mit 1 n NaOH aufgelöst. Davon wurden 0,2 ml zur Proteinbestimmung nach Lowry (24) eingesetzt.

Protokoll

Bestimmung der ATPase-Aktivität (s. Abb. 7 a)

Versuchsansatz: 0,2 ml ATP

0,2 ml $MgCl_2$

0,5 ml NaCl bzw. H_2O (Endkonzentration: 0,10,
20, 30, 50, 100 mMol/l)

0,1 ml ATPase-Präparation (wird in Abständen
von 15" einpipet-
tiert)

Nach 20 Min. Inkubation bei 30° C im Wasserbad wird durch Zugabe von 0,5 ml 15 % TCE das Protein gefällt. Die Ansätze werden 30 Min. im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend 30 Min. bei 3000 g zentrifugiert. In 0,5 ml des Überstandes wird das freigesetzte anorganische Phosphat nach Fiske et al. (23) im Sediment Protein nach Lowry et al. (24) bestimmt.

Phosphatbestimmung

I + II = Doppelbestimmungen

Lt_0 = Leerwert zur Zeit $t = 0$

L_{ATP} = Ansatz ohne ATPase-Präparation

	ΔE I	ΔE II
Lt_0	0,024	0,026
L_{ATP}	0,022	0,022
Eichwert 10 ug PO_4	0,150	0,152

$[Na^+]$ im An- satz	ΔE I	ΔE II	Mittel- wert	Mittel- wert - Leerwert	$\frac{\mu Mol PO_4}{mg Protein \cdot h}$
0	0,117	0,115	0,116	0,091	4,95
30	0,133	0,135	0,134	0,109	5,90
100	0,128	0,126	0,127	0,102	5,52

Der Mittelwert der Proteinbestimmung ist: $\Delta E = 0,196$.

Daraus ergibt sich nach Berücksichtigung der Verdünnung ein Proteingehalt im Ansatz von 355 γ .

Bestimmung der intrazellulären K- und Na-Konzentration

Die über Nacht im Nährmedium gewachsenen Bakterien wurden 10 Min. bei 10.000 g in der Servall-Zentrifuge abzentrifugiert. Bei den Versuchen mit K-reichen Bakterien wurden die sedimentierten Bakterien direkt eingesetzt. Bei Verwendung von K-armen Bakterien wurden die Zellen noch 2 mal mit bidestilliertem Wasser auf der Zentrifuge gewaschen. Die Bakterien wurden für die Versuchsansätze mit den verschiedenen Medien ohne Zugabe der zum Wachstum nötigen Aminosäuren in 50 ml Plastikbecher gegeben und bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Das Volumen der Ansätze betrug immer 40 ml, die Zellkonzentrationen lagen zwischen 0,2 und 0,3 %. Nach der Inkubation wurden die Zellen 10 Min. bei 10.000 g zentrifugiert. Die Zentrifugenbecher wurden mit Zellstoff ausgetupft und das Feuchtgewicht der Bakterien bestimmt. Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurden die Bakterien über Nacht im Vakuum-Trockenschrank bei 80° C und 1 Torr getrocknet.

Um den Na- und K-Gehalt der Bakterien-Trockensubstanz zu bestimmen, wurden ca. 10 mg mit 0,2 ml 10 n HNO_3 60 Min. bei 100° C erhitzt. Nach Zugabe von 5 ml bidestilliertem Wasser und kräftigem Umschütteln wurde im Flammenphotometer Eppendorf mit Acetylen-Preßluft der Na- und K-Gehalt bestimmt. In den Überständen wurde der pH-Wert gemessen und ebenfalls der Na- und K-Gehalt bestimmt.

Protokoll

Versuch:

Abhängigkeit des intrazellulären K-Gehaltes von der extrazellulären Na-Konzentration (s. Abb. 19)

E. coli B 163 und E. coli B 525 wurden über Nacht in je 2 l Nährmedium gezüchtet. Die Zellen wurden in je 4 Zentrifugenbechern von je 180 ml 10 Min. bei 10.000 g zentrifugiert.

Zu den sedimentierten Zellen wurden in je 4 Ansätzen zugegeben:

1. 85 ml NaCl (150 mMol/l)
2. 85 ml NaCl (75 mMol/l) + Cholin (75 mMol/l)
3. 85 ml NaCl (37,5 mMol/l) + Cholin (112,5 mMol/l)
4. 85 ml Cholin (150 mMol/l)

Die Inkubation erfolgte bei 37° C im Wasserbad. Nach 10 und 30 Min. wurden je 40 ml der Bakterien-Suspension entnommen, 5 Min. bei 15.000 g zentrifugiert und nach Austupfen der Plastikbecher das Feuchtgewicht der sedimentierten Bakterien bestimmt.

Die Bakterien wurden über Nacht bei 80° C und 1 Torr im Vakuum-Trockenschrank getrocknet.

Ansatz	Trockene Zentr.-Becher	Becher + frische Bakterien	Bakterien-Feuchtgewicht	Bakterien-Trockengewicht	% H ₂ O
Na ⁺ _{EZF} =0	10,04956 g	10,21560 g	166,04 mg	34,4 mg	79,6

Etwa 10 mg der Trockensubstanz wurden eingewogen und mit 0,2 ml 10 n HNO₃ eine Stunde bei 100° C erhitzt, mit 5 ml bidestilliertem Wasser versetzt und flammenphotometriert.

Beispiel für die Berechnung des K-Gehaltes:

Einwaage mg	Skalenteile am Flammenphotometer	mMol/l K aus Eichkurve	-Leerwert = 0,03	1	2	3	4	5
10,28	54,5	1,08	1,05	5,46	0,531	106,2	106,1	177,1

1 = mMol/l K aus Eichkurve $\times 5,2 = \mu\text{Mol K} / \text{Ansatz}$

2 = $\mu\text{Mol K} / \text{Ansatz} : \text{Einwaage} = \mu\text{Mol K} / \text{mg Trockensubstanz}$

3 = $\mu\text{Mol K} / \text{mg Trockensubstanz} \times 1000 : 5 = \text{mMol K} / \text{kg Feuchtgewicht}$

4 = mMol K / kg Feuchtgewicht - 20 % K_{EZF}

5 = mMol K / kg Feuchtgewicht : 0,6 = mMol K / l H_2O

Erläuterung der Abkürzungen

DNS = Desoxyribonucleinsäure

ATP = Adenosintriphosphat

ADP = Adenosindiphosphat

AMP = Adenosinmonophosphat

TCE = Trichloressigsäure

EZF = Extrazelluläre Flüssigkeit

IZF = Intrazelluläre Flüssigkeit

DOC = Desoxycholat

EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure

DNP = Dinitrophenol

Zusammenfassung

Bei *E. coli* B 163 und seiner K-Mangelmutante *E. coli* B 525 untersuchten wir die Abhängigkeit der ATPase-Aktivität vom pH, von der Mg^{2+} - und von der Substratkonzentration sowie die Substrat- und Metallionenspezifität.

Die ATPase aus beiden Stämmen wird durch Na um 20 % aktiviert. K und Strophanthin haben keine Wirkung. Durch Behandlung mit Desoxycholat wird die ATPase-Aktivität erhöht, die Aktivierbarkeit durch Na ändert sich dabei nicht.

Zwischen den ATPasen aus *E. coli* B 163 und B 525 bestehen keine Unterschiede.

Der intrazelluläre Na- und K-Gehalt von *E. coli* B 163 und seiner K-Mangelmutante *E. coli* B 525 wurde in Abhängigkeit von der extrazellulären K-, Na- und H^+ -Konzentration sowie in Gegenwart verschiedener Substrate und Stoffwechselinhibitoren untersucht.

E. coli B 163 und seine K-Mangelmutante B 525 transportieren K aktiv in die Zelle. Durch die Mutation ist der Austritt des K aus der Zelle erhöht. Die Versuchsergebnisse lassen auf eine Carrier-begünstigte Diffusion des K aus der Zelle schließen. Dieser Carrier müßte durch die Mutation eine höhere Affinität für K bekommen haben und nun gleichzeitig mit Na reagieren.

Literatur:

1. Csaky, T.Z. Ann. Rev. Physiol.
27, 415 (1965)
2. Solomon, A. K. J. gen. Physiol.
36, 57 (1952)
3. Hastings, A.B.,
 McIntosh, J.F.,
 Sendroy, J.,
 Van Slyke, D.D. J. Biol. Chem.
79, 193 (1928)
4. Frazier, H. S.,
 Sicular, A.,
 Solomon, A. K. J. gen. Physiol.
37, 631 (1954)
5. Eichelberger, L.,
 Fetcher, E. S.,
 Geiling, E. M. K.,
 Vos, B. J. jr. J. Biol. Chem.
133, 145 (1940)
6. Kerr, S. E. J. Biol. Chem.
117, 227 (1937)
7. Tosteson, D. C. Fed. Proceedings
22, 19 (1963)
8. Dulce, H. J.,
 Günther, Th. Naumyn-Schmiedeberg's Arch. exp.
 Path. + Pharm.
238, 368 (1960)
9. Hempling, H. G. J. gen. Physiol.
41, 565 (1958)
10. Solomon, A. K. Biophys. J.
2, 79 (1962)

11. Evans, J. V.,
Biking, J. W. Nature
176, 171 (1955)
12. Lubin, M., Kessel, D. Biochem. Biophys. Res. Comm.
2, 249 (1960)
13. Schultz, S., Solomon, A.K. Nature
187, 802 (1960)
14. Davis, B. D. J. Am. Chem. Soc.
70, 4267 (1948)
15. Gorini, L., Kaufmann, H. Science
131, 604 (1960)
16. Skou, J. C. Symposium on Membran Trans-
port Publishing House of CSSR
Prag, 1961
17. Skou, J. C. Biochim. biophys. Acta
42, 6 (1960)
18. Post, R. L.,
Merritt, C. R.,
Kinsolving, C. R.,
Albright, C. D. J. Biol. Chem.
235, 1796 (1960)
19. Järnefelt, J. Biochim. biophys. Acta
59, 643 (1962)
20. Chan, P. C., Calabrese, V.
Theil, L. S. Biochim. biophys. Acta
79, 424 (1964)
21. Tosteson, D. C.,
Moulton, R. H.,
Blaustein, M. Fed. Proceedings
19, 128 (1960)

22. Abrams, A., McNamara, P.
Johnson, F. G. J. Biol. Chem.
235, 3659 (1960)
23. Fiske, C. H.,
Subbarow, Y. J. Biol. Chem.
66, 375 (1925)
24. Lowry, O. H.,
Rosebrozgh, N. J.,
Farr, A. L., Randall, R.J. J. Biol. Chem.
193, 265 (1951)
25. Weibull, C.,
Greenawalt, J. W., Löw, H. J. Biol. Chem.
237, 847 (1962)
26. Drapeau, G. R.,
McLeod, R. A. J. of Bact.
85, 1413 (1963)
27. Hoffmann, J. F. Circulation XXVI, 1201 (1962)
28. Greenawalt, J. W.,
Weibull, C. J. Biol. Chem.
237, 853 (1962)
29. Skou, J. C. Biochim. biophys. Acta
23, 394 (1957)
30. Dunham, E. T.,
Glynn, I. M. J. of Physiol.
156, 274 (1961)
31. Schatzmann, H. J. Helvet. Physiol. Acta
11, 346 (1953)
32. Charnock, J. S.,
Post, R. L. Nature
199, 910 (1963)

33. Gardos, G. *Experienta*
20, 127 (1964)
34. Skou, J. C. *Biochim. biophys. Acta*
58, 314 (1962)
35. Solomon, A. K. *Biophys. J.*
2, 79 (1962)
36. Järnefelt, J. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*
17, 215 (1964)
37. Schultz, S. G.,
Solomon, A. K. *J. gen. Physiol.*
45, 355 (1961)
38. Günther, Th. persönliche Mitteilung
39. Schultz, S. G.,
Epstein, W.,
Solomon, A. K. *J. gen. Physiol.*
47, 329 (1963)
40. Torriani, A. *Biochim. biophys. Acta*
38, 460 (1960)
41. Neu, H. C.,
Heppel, L. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*
17, 215 (1964)
42. Voelz, H. *J. of Bact.*
88, 1196 (1964)
43. Skou, J. *Physiological Rev.*
45, 596 (1965)
44. Krebs, H. A., Whittam, R.
Hems, R. *Biochemical J.*
66, 53 (1957)

45. Epstein, W.,
Schultz, S. G., J. gen. Physiol.
49, 221 (1965)
46. Slayman, C. W.,
Tatum, E. L. Biochim. biophys. Acta
109, 184 (1965)
47. Lubochinsky, B.,
Meury, J., Stolkowski, J. C. R. Acad. Paris
258, 5106 (1964)
48. Harold, F. M.,
Harold, R. L., Baarda, J.R.,
Abrams, A. Biochemistry
6, 1777 (1967)
49. Epstein, W.,
Schultz, S. G. J. gen. Physiol.
49, 469 (1966)
50. Horecker, B. L.,
Thomas, J., Monod, J. J. Biol. Chem.
235, 1586 (1960)
51. Hoffee, P., Englesberg, E.,
Lamy, F. Biochim. biophys. Acta
79, 337 (1964)
52. Kepes, A. Biochim. biophys. Acta
40, 70 (1960)

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Th. Günther
möchte ich für die Überlassung des The-
mas sowie seine Beratung und Unterstüt-
zung danken.

L e b e n s l a u f

Am 31. März 1940 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Karl Dorn und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Tränkle, in Singen/Htwtl. geboren. Nach dem 4-jährigen Besuch der Volksschule in Gottmadingen, dem Arbeitsplatz meines Vaters, trat ich im Herbst 1950 in die Sexta des Realgymnasiums in Singen ein. Im Frühjahr 1959 bestand ich dort die Reifeprüfung. Von April 1959 bis September 1960 leistete ich einen verlängerten Wehrdienst bei der Bundeswehr ab. Im Wintersemester 1960/61 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität in Freiburg/Brsg., wo ich im Herbst 1961 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ablegte. Im Wintersemester 1961/62 wurde ich an der medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im August 1963. Während der klinischen Semester arbeitete ich als Doktorand und Hilfsassistent im physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin. Mein Doktorvater war Herr Priv.-Doz. Dr. Günther. Am 19. Sept. 1967 bestand ich das medizinische Staatsexamen. Seit Oktober 1967 arbeite ich als Medizinalassistent am physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin.

